

# 传染性支气管炎病毒 S1 和 N 基因遗传变异频率的分析

盛晓丹<sup>1,2#</sup>, 徐怀英<sup>1#</sup>, 刘霞<sup>2</sup>, 黄迪海<sup>2</sup>, 曲新泽<sup>2</sup>, 秦卓明<sup>1,2\*</sup>

(1. 山东省农业科学院家禽研究所, 济南 250100; 2. 山东省健牧生物药业有限公司, 济南 250100)

**摘要:** 旨在探讨中国北方地区传染性支气管炎病毒(IBV)的流行和分子变异, 进而探讨 IBV 的遗传演变规律。利用生物信息学方法对 IBV 纤突蛋白(S1)和核蛋白(N)编码基因进行分析比较。结果显示: 2012—2013 年发生在山东、天津等北方地区的 IBV 流行株高度同源, 其 S1 基因核苷酸(氨基酸)相似性为 94.0%~100% (93.1%~100%), N 基因为 98.4%~99.1% (98.1%~99.8%), 而与经典疫苗株 H<sub>120</sub> 相似性均较低, 且至少在 S1 基因的 3 个高变区产生了较多的点突变、缺失和插入, 且变异集中在第 53—150 和 250—290 位, 以高变区 HVR I 居多, GM/13 在 62—65 位缺失 4 个氨基酸。进一步的分析表明: IBV 流行株 S1 基因与 1998 年在我国北方流行的 A2 株核苷酸相似性最高, 为 94.9%~97.2%, 年核苷酸(nt)变异频率平均为  $2.4 \text{ nt} \times 10^{-3}$ ; 而 N 基因则与 LX4 株相似性最高, 为 93.0%~93.5%, 年变异频率平均为  $5.1 \text{ nt} \times 10^{-3}$ 。IBV 流行株可能是 A2-like 和 LX4-like 毒株的重组, 且 N 基因的变异频率明显高于 S1 基因。

**关键词:** IBV; S1 基因; N 基因; 遗传变异频率

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)06-0989-09

## Genetic Variation Frequency of S1 and N Gene of Infectious Bronchitis Virus

SHENG Xiao-dan<sup>1,2#</sup>, XU Huai-ying<sup>1#</sup>, LIU Xia<sup>2</sup>, HUANG Di-hai<sup>2</sup>, QU Xin-ze<sup>2</sup>, QIN Zhuo-ming<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

2. Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, China)

**Abstract:** This study was undertaken to investigate the prevalence and molecular variation of infectious bronchitis virus in the northern area of China. Thirteen infectious bronchitis viruses (IBV) strains obtained from commercial chickens in northern China between 2012 and 2013 were isolated and identified by the sequencing of the entire S1 gene. The variants were distinguished by phylogenetic analysis and alignment in comparison with the vaccination-challenge tests that were performed using heterogeneous strains. The results showed that both the S1 and N gene of the prevailing IBV shared higher homologies. Furthermore, S1 gene shared nucleotide (amino acid) homology of 94.0%-100% (93.1%-100%), and N gene had nucleotide (amino acid) 98.4%-99.1% homology (98.1%-99.8%), respectively. Compared with the classical vaccine strain, there were at least three hyper-variable regions were found in S1 gene, and point mutations, deletions and insertions of IBV strains were also occurred at the genomic level, which were concentrated in the 53-150, and 250-290. Four amino acids were found missing in GM/13 at 62-65. Further analy-

收稿日期: 2014-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(31372332); 科技部农转资金(SQ2013ECC600059); 山东省科技攻关重点支持项目(2009GG10009006); 济南市成果转化支持项目(2012CG92)

作者简介: 盛晓丹(1985-), 女, 山东潍坊人, 助理研究员, 主要从事动物传染病防控研究, E-mail: sxd1985wl@163.com; 徐怀英(1976-), 女, 山东冠县人, 副研究员, 主要从事动物传染病和免疫学研究, E-mail: hyingxu@163.com。二人对本文同等贡献

\* 通信作者: 秦卓明, E-mail: qinzm1997@163.com

sis showed that the IBV epidemic strains shared highest homology (94.9%-97.2%) with A2 strains and the nucleotide (nt) mutation frequency averaged  $2.4 \text{ nt} \times 10^{-3}/\text{year}$  in view of S1 gene; while, the N gene was the LX4 strains of the homologous highest (93.0%-93.5%), the average annual variation in frequency  $5.1 \text{ nt} \times 10^{-3}/\text{year}$ . Those findings suggest that the recent IBV epidemic strains may be recombinant of A2 and LX4 type strains, and N gene mutation frequency is greater than of the S1 gene.

**Key words:** infectious bronchitis virus; S1 gene; N gene; mutation frequency

传染性支气管炎(infectious bronchitis, IB)是由传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)引起的发生于鸡的一种急性、高度接触性呼吸道疾病,主要侵害鸡的呼吸系统、泌尿生殖系统和消化系统。IBV属于冠状病毒科冠状病毒属,为单股正链RNA,约27 kb<sup>[1]</sup>。

IBV含有3种主要结构蛋白,即纤突蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)和核蛋白(nucleocapsid, N)<sup>[2]</sup>。S蛋白位于IBV囊膜,由S1和S2两个亚单位组成<sup>[3]</sup>,编码540个氨基酸,可诱导机体产生中和抗体和血凝抑制(haemagglutination inhibition, HI)抗体<sup>[4]</sup>,是IBV基因组中最重要和最易发生变异的部位<sup>[5]</sup>。研究表明,S1基因同源性越低,交叉保护越差<sup>[6-8]</sup>。N蛋白位于病毒内部,常与RNA结合构成螺旋状核衣壳。早期认为N蛋白在IBV的进化过程中保守,但近年来的研究表明,N基因亦存在广泛的变异。

本研究对2012—2013年在中国北方地区分离的IBV进行分离鉴定,克隆其S1和N基因,综合

前期研究的结果,与国内外经典IBV疫苗株进行同源性比较分析,绘制系统发育树,并首次对其核苷酸变异频率进行分析比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 毒株 从辽宁、天津、山东等多个疑似感染IBV的鸡群中,采集气管、肾和肺等组织,按常规通过SPF鸡胚进行病毒分离鉴定,获得13株IBV(表1)。

1.1.2 主要试剂 RNAiso Plus、M-MLV、RNA酶抑制剂及dNTP混合物、Taq DNA聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。SPF鸡与鸡胚由山东省农业科学院家禽研究所SPF鸡场提供。

### 1.2 动物回归试验

选取不同地域有代表性的4株IBV分离株TJ-1/13、GM/13、LY-1/13和LY-3/13,按1:10稀释,分别通过滴鼻点眼途径接种10只7d SPF鸡,每只

表1 IBV病毒分离时间和临床病变

Table 1 Main IBV isolates and pathogenicity listed in different time and fields

| 毒株 Strains      | 分离年 Year | 分离地点 Location | 缩写 Abb. | 临床病变 Pathogenicity |
|-----------------|----------|---------------|---------|--------------------|
| CK SD XT 2012   | 2012     | 烟台 Yantai     | XT/12   | Nephritis          |
| CK SD ZL 2012   | 2012     | 潍坊 Weifang    | ZL/12   | Nephritis          |
| CK SD MH 2012   | 2012     | 潍坊 Weifang    | MH/12   | Nephritis          |
| CK SD FX 2012   | 2012     | 威海 Weihai     | FX/12   | Nephritis          |
| CK TJ-2 2012    | 2012     | 天津 Tianjin    | TJ-2/12 | Nephritis          |
| CK TJ-3 2012    | 2012     | 天津 Tianjin    | TJ-3/12 | Nephritis          |
| CK TJ-1 2013    | 2013     | 天津 Tianjin    | TJ-1/13 | Nephritis          |
| CK TJ-2 2013    | 2013     | 天津 Tianjin    | TJ-2/13 | Nephritis          |
| CK HB CZ 2012   | 2012     | 沧州 Cangzhou   | CZ/12   | Nephritis          |
| CK LN LY-1 2013 | 2013     | 辽阳 Liaoyang   | LY-1/13 | Nephritis          |
| CK LN LY-2 2013 | 2013     | 辽阳 Liaoyang   | LY-2/13 | Nephritis          |
| CK LN LY-3 2013 | 2013     | 辽阳 Liaoyang   | LY-3/13 | Nephritis          |
| CK SD GM 2013   | 2013     | 潍坊 Weifang    | GM/13   | Nephritis          |

0.1 mL,同时设 SPF 鸡对照 10 只,观察 14 d,记录实验鸡发病情况。

### 1.3 引物设计

参照 GenBank 已公布的 IBV 基因组 S1 和 N 基因序列,利用 Primer premier5.0 设计 2 对引物,引物由上海生物工程有限公司合成。S1 和 N 基因扩增产物分别为 1 783 和 1 488 bp。S1-F:5'-GCA-ACGCCAGTTGTTAATTTG-3', S1-R: 5'-CAG-CTTTAACGAACCATCTGG-3'; N-F: 5'-AGCA-ATAGCAAGAAAAGCGC-3', N-R: 5'-GCACAT-AATCACAATCAATGCC-3'。

### 1.4 RT-PCR 扩增与测序

按 RNAiso Plus 说明书从尿囊液中提取病毒 RNA,通过 RT-PCR 扩增 S1 和 N 基因。程序:42 °C 反转录 30 min,94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s;56 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 90 s,35 个循环;最终延伸 10 min。将经过电泳鉴定的 PCR 产物送往北京六合华大公司测序。

### 1.5 S1 和 N 基因同源性比较、系统发育分析和核苷酸变异频率分析

将 IBV S1 和 N 基因测序结果在 NCBI 数据库进行 Blast,用 DNASTar 和 DNAMAN 软件分别进行序列拼接,然后进行核苷酸(nt)和氨基酸(aa)同源性比较,利用 MEGA 5.1 软件绘制各自的系统发育树,同时分析其分子特征变化和变异频率(K)<sup>[9]</sup>,核苷酸变异频率计算公式: $K(\%) = \frac{1}{2} \ln[(1-2P/T-2Q/T)(1-2Q/T)^{1/2}]$ 。T 表示核苷酸总数;P 表示转换核苷酸数;Q 表示颠换核苷酸数。

## 2 结 果

### 2.1 病毒的分离鉴定

2012—2013 年在北方发生的 IBV,临床发病以肾的病变为主,呼吸道症状轻微,主要病变为肾肿胀、淤血,并伴有不同程度的尿酸盐沉积。经 SPF 鸡胚传代,大多数 IBV 毒株尽管第 1 代未出现病症,但在第 2 代以后陆续出现了典型的“侏儒胚”变化:个体发育较小,头、爪合抱在一起,鸡胚蜷缩,活性较差。取鸡胚尿囊液分别进行 IBV 特异性 RT-PCR 检测和 HA 检测。结果 HA 检测阴性,均扩增出 IBV 目的片段。

### 2.2 动物回归试验

在 SPF 鸡接种 4 种 IBV 分离毒 2~3 d 后,攻

毒组均出现甩鼻、咳嗽等呼吸道症状,死亡率在不同毒株间有差异,TJ-1/13、GM/13、LY-1/13 和 LY-3/13 死亡鸡只分别为 3、6、4 和 2。以 GM/13 死亡最多,60%死亡,LY-3/13 最少,仅 20%死亡。死亡鸡与临床发病鸡群剖检症状相同,表现为输尿管尿酸盐沉着,肾大并伴有尿酸盐沉积,发病鸡脱水严重。未攻毒组 SPF 鸡生长发育正常。

### 2.3 测序结果

13 株 IBV S1 基因核苷酸(nt)为 1 720 bp,4 株 N 基因为 1 440 bp,分别编码 540 和 409 个氨基酸(aa)。

### 2.4 S1 基因同源性比较和分子特征分析

13 株 IBV 流行株之间 S1 核苷酸(氨基酸)序列相似性为 94.0%~100%(93.1%~100%);与 1998 年在北方流行的 A2 毒株 nt(aa)相似性最高,为 94.9%~97.2%(94.6%~96.6%);与 LX4 的 nt(aa)相似性仅为 93.1%~94.2%(92.5~94%);而与经典疫苗株 H<sub>120</sub> 的 S1 nt(aa)相似性不足 74%(75%)。

以中国常用疫苗株 H<sub>120</sub>、M<sub>41</sub> 和欧洲疫苗株 4/91 为参照,对我国 IBV 主要流行株进行氨基酸变异位点分析(表 2)。11 株 IBV 流行株 S1 蛋白氨基酸的突变主要集中在第 53—150 和 250—290 位。此外,在多处发生明显的点突变,其中 LY-3/13、GM/13、LY-1/13 在第 56—69 位的变异最大,且 GM/13 在 62—65 位缺失 4 个氨基酸。GM/13、LY-1/13 与 TJ-1/13 的 S 蛋白切割识别位点均为 HRRRR,而 LY-3/13 则为 HRCRR。

比较还证实:同一基因型毒株氨基酸替代较一致,如在 53 位点,Mass-like 毒株均为异亮氨酸(I),4/91-like 毒株均为缬氨酸(V),SD-like 与 A2-like 毒株均为色氨酸(S);而不同基因型的 IBV 毒株氨基酸则有较大差异,如在 56 位点,Mass-like 毒株为谷氨酸(E),4/91-like 毒株为色氨酸(G),SD-like 毒株为赖氨酸(K),而 A2-like 毒株为组氨酸(H)或酪氨酸(Y)。值得关注的是,有些位点的氨基酸为不同分支毒株所共有,如在 62 位点 Mass-like、4/91-like 与 A2-like 毒株均为 S;而 1997—1999 年的 3 个山东毒株 SD-B-97、SD-D-98、SD-HD-99 等在相同位点均为苏氨酸(T),反应出毒株之间的内在联系性,同时显示出毒株的特异性。

### 2.5 系统发育

根据 IBV S1 基因的核苷酸序列同源性可将 IBV 至少分为八大类,包括 A2-like、4/91-like、

表 2 IBV 流行株与参考株在 S1 高变区 I 氨基酸的主要差异

Table 2 Main difference of amino acids in S1 HVR I among IBV isolates and the references

| 类别 Class  | 毒株 Strains     | 高变区 I 氨基酸 Amino acids in S1 HVR I |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |   |   |   |    |    |    |   |   |    |    |     |   |   |   |   |
|-----------|----------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|---|---|---|----|----|----|---|---|----|----|-----|---|---|---|---|
|           |                | S                                 | T | Y | T | S | A | S | E | T | V | V | 70 | 71 | I | K | - | 82 | 85 | 88 | A | P | 96 | 97 | 100 | A | K | S |   |
| Mass-like | H120           | I                                 | S | E | S | • | S | • | G | • | • | I | •  | R  | N | - | S | S  | S  | S  | S | S | S  | S  | •   | S | • | S | T |
|           | M41            | I                                 | F | E | S | • | S | P | G | • | • | T | •  | R  | N | - | S | S  | S  | S  | S | S | S  | •  | S   | • | S | T |   |
| 4/91-like | 4/91(AF093794) | V                                 | F | G | • | • | V | • | D | • | A | T | F  | -  | S | I | • | •  | •  | •  | • | • | A  | S  | V   | • | V | T |   |
|           | TaiAn          | V                                 | F | G | • | • | V | • | D | • | A | T | F  | -  | S | I | • | •  | •  | •  | • | • | A  | S  | V   | • | V | T |   |
| SD-like   | SC 2006        | V                                 | F | G | • | • | V | • | D | • | A | T | F  | -  | S | I | • | •  | •  | •  | • | • | A  | S  | V   | • | V | T |   |
|           | SD-D 1998      | •                                 | • | K | F | T | • | • | • | S | • | • | L  | S  | G | • | S | F  | P  | K  | • | • | •  | •  | •   | • | • | T |   |
| A2-like   | SD-B 1997      | •                                 | • | K | F | T | • | • | • | S | • | • | L  | S  | G | • | S | F  | P  | K  | • | • | •  | •  | •   | • | • | T |   |
|           | SD-HD 1999     | •                                 | • | K | F | T | • | • | • | S | • | • | L  | S  | G | • | S | S  | S  | T  | • | • | •  | •  | •   | • | • | T |   |
| A2-like   | A2 1998        | •                                 | • | H | • | • | • | • | G | • | • | • | •  | •  | - | • | • | L  | •  | •  | • | L | •  | •  | •   | • | • |   |   |
|           | LX4(AY338732)  | •                                 | • | S | • | • | • | • | • | • | • | • | •  | •  | - | • | • | L  | •  | •  | • | L | •  | •  | •   | • | • |   |   |
| A2-like   | TJ-2/12        | •                                 | • | • | • | • | • | • | A | • | • | • | •  | •  | - | • | • | •  | •  | •  | • | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |
|           | XT/12          | •                                 | • | H | • | • | • | • | • | • | • | • | •  | •  | - | • | • | •  | •  | •  | • | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |
| A2-like   | MH/12          | •                                 | • | • | • | • | • | E | H | • | • | • | •  | •  | - | • | • | L  | •  | •  | L | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |
|           | LY-1/13        | •                                 | • | • | • | • | • | E | H | • | • | • | •  | •  | - | • | • | L  | •  | •  | L | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |
| A2-like   | TJ-1/13        | •                                 | • | H | • | • | • | • | G | • | • | • | •  | •  | - | • | • | •  | •  | •  | • | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |
|           | GM/13          | •                                 | • | • | • | • | - | - | - | • | • | • | •  | •  | - | • | • | •  | •  | •  | • | • | •  | •  | •   | • | • |   |   |

•, 氨基酸相同; -, 氨基酸缺失

••, Identical amino acid; -•, Amino acid absence

Mass-like、Conn-like、T-like 等(图 1),其中,13 株 2012—2013 年在北方分离的 IBV 流行株与 A2 株系统发育关系最密切,而与疫苗株 H<sub>120</sub>、H<sub>52</sub>、M<sub>41</sub>、4/91 等遗传关系相对较远。

## 2.6 N 基因同源性比较和系统进化

4 株 IBV 流行株 N 基因之间核苷酸(氨基酸)相似性较高,为 98.4%~99.1%(98.8%~99.8%),但与经典疫苗株 H<sub>120</sub> 的相似性相对较低,为 85.7%~86.4%(91.0%~91.7%),表现出明显差异。对 4 株 IBV 分离株的 N 基因序列进行分析,结果发现无碱基的缺失和插入,但存在点突变,且 N 基因存在广泛的氨基酸替代,变异主要集中在 179—236、340—370 位碱性氨基酸区。系统进化见图 2。

## 2.7 1998—2013 年中国北方地区 IBV S1 和 N 基因的核苷酸变异频率

由同源性比较可知,IBV 流行株在 S1 基因与

我国 1998 年在北方最早流行的 A2 同源性最高,核苷酸相似性为 94.9%~97.2%,而与 LX4 的相似性仅为 93.4%~95.4%。以 A2 为参考毒株,则发现 1998—2013 年间 IBV 流行株 S1 基因的核苷酸年平均变异频率为  $2.4 \times 10^{-3}$ (表 3)。

2013 年 4 株 IBV 流行株在 S1 基因与我国 1998 年 A2 株核苷酸相似性最高,为 95.6%~97.2%;与我国 1999 年在北方最早流行的 LX4 的相似性为 94.7%~96.1%;相应的 N 基因则与 LX4 核苷酸相似性最高(93.2%~93.8%),与 A2 的相似性仅为 90.4%~90.6%(表 4)。结合 IBV 属于冠状病毒,具有“跳跃式复制”的特点,且校对机制不完善的特点,推测 IBV 分离株在流行过程中可能存在 A2-like 和 LX4-like 毒株之间的重组。

以 LX4 为参考毒株,则发现 1999 年以来,IBV 流行株 N 基因的核苷酸年平均变异频率为  $5.1 \times$

表 3 1998—2013 年间 IBV 流行株 S1 基因的核苷酸变异频率

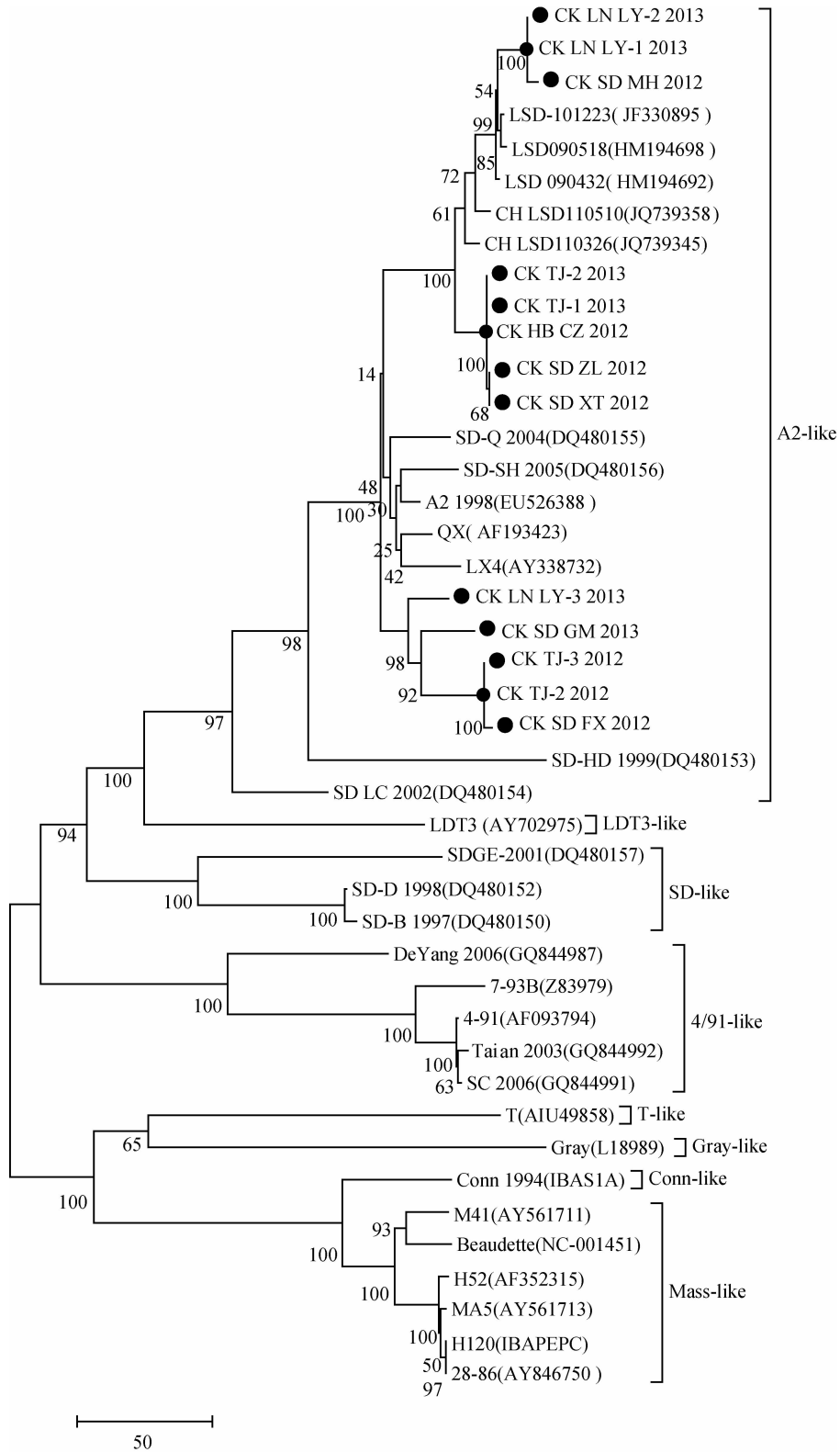
Table 3 S1 gene mutation frequency of IBV isolates from 1998 to 2013

| 毒株<br>Strain | 分离年<br>Year of isolation | nt 变异数量<br>Variation number<br>of nt | 转换(P)<br>Transition | 颠换(Q)<br>Transversion | 变异频率<br>Mutaton frequency | 年平均变异率( $\times 10^{-3}$ )<br>Mutation frequency<br>per year ( $\times 10^{-3}$ ) |
|--------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|---|
| A2           | 1998                     | 0                                    | 0                   | 0                     | 0                         |   |
| TJ-3/12      | 2012                     | 48                                   | 34                  | 14                    | 0.035                     |   |
| TJ-2/13      | 2013                     | 49                                   | 32                  | 17                    | 0.037                     |   |
| TJ-2/12      | 2012                     | 48                                   | 34                  | 14                    | 0.035                     |   |
| TJ-1/13      | 2013                     | 49                                   | 32                  | 17                    | 0.037                     |   |
| ZL/12        | 2012                     | 50                                   | 33                  | 17                    | 0.037                     |   |
| XT/12        | 2012                     | 50                                   | 33                  | 17                    | 0.037                     |   |
| MH/12        | 2012                     | 65                                   | 42                  | 23                    | 0.049                     | 2.4 (1.6~3.3)   |
| GM/13        | 2013                     | 45                                   | 36                  | 9                     | 0.031                     |   |
| FX/12        | 2012                     | 50                                   | 35                  | 15                    | 0.037                     |   |
| LY-3/13      | 2013                     | 32                                   | 28                  | 8                     | 0.025                     |   |
| LY-2/13      | 2013                     | 61                                   | 41                  | 20                    | 0.045                     |   |
| LY-1/13      | 2013                     | 61                                   | 41                  | 20                    | 0.045                     |   |
| CZ/12        | 2012                     | 49                                   | 32                  | 17                    | 0.037                     |   |

表 4 2013 年 IBV 分离株 S1 和 N 基因与 A2、LX4 及其与疫苗株的核苷酸同源性比较

Table 4 Nucleotide acids homologies of IBV isolates in 2013 comparing with vaccine references

| 毒株<br>Strain | A2   |      | LX4  |      | H120 |      | 4/91 |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|              | S1   | N    | S1   | N    | S1   | N    | S1   | N    |
| TJ-1/13      | 96.8 | 90.4 | 95.3 | 93.6 | 78.2 | 87.1 | 78.9 | 87.6 |
| GM/13        | 97.1 | 90.5 | 96.1 | 93.2 | 77.8 | 86.9 | 78.9 | 87.9 |
| LY-1/13      | 95.6 | 90.6 | 94.7 | 93.8 | 77.4 | 87.5 | 78.4 | 88.1 |
| LY-3/13      | 97.2 | 90.6 | 96.1 | 93.2 | 78.0 | 87.1 | 79.2 | 87.9 |



毒株名后是其 GenBank 登陆号;●表示本研究毒株。图 2 同

GenBank No. were listed after the names of IBV;● indicates the used strain in this study. The same as below

图 1 13 株 IBV 分离株与参考株 S1 基因核苷酸序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of nucleotide sequence of the S1 gene from the 13 IBV isolates in this study and the reference strains

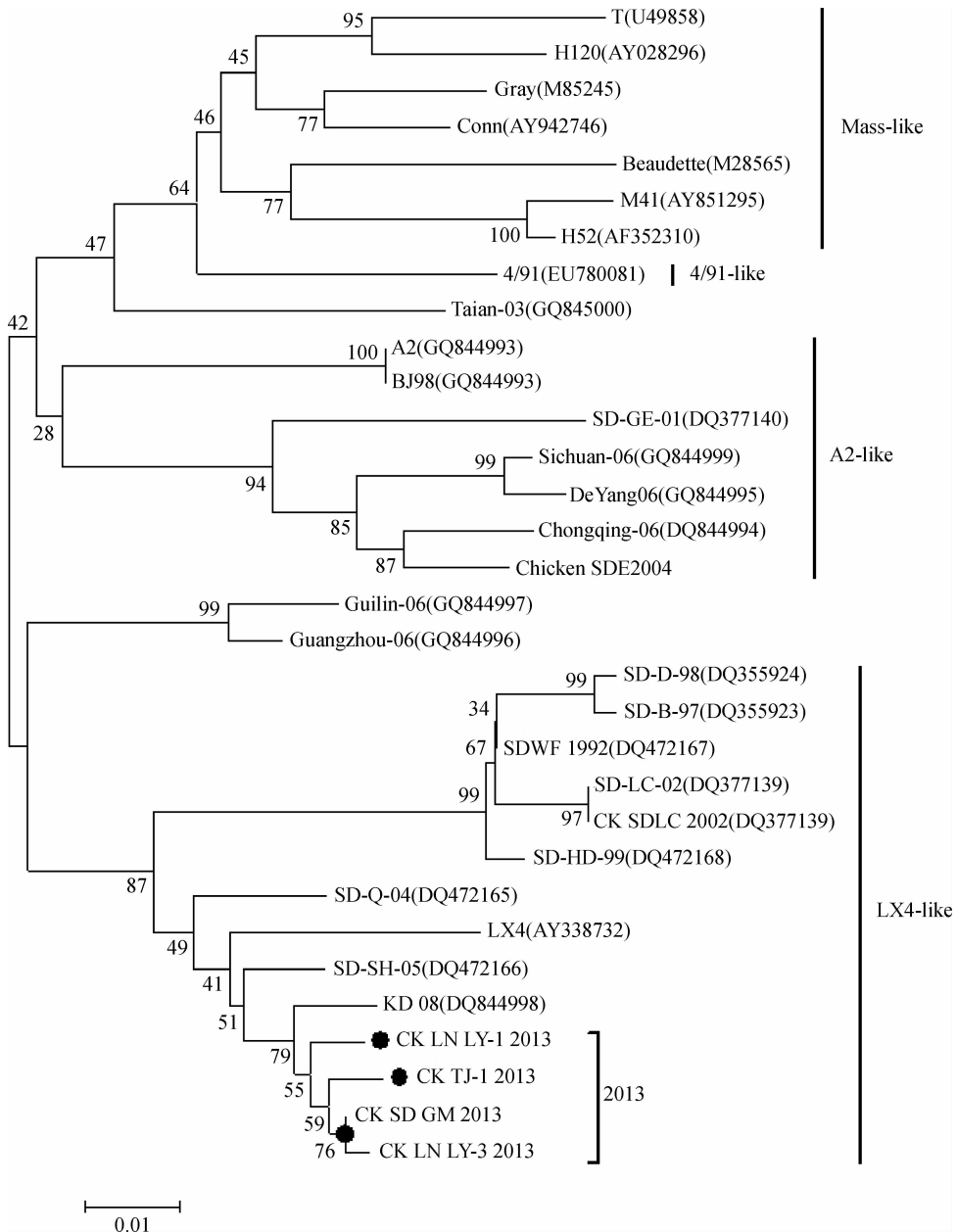


图 2 4 株 IBV 分离株与参考株 N 基因核苷酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of nucleotide sequence of the N gene from the 4 IBV isolates in this study and the 22 reference strains

$10^{-3}$ , 明显高于 S1 基因(表 5)。

### 3 讨论

我国 IBV 流行株血清型和基因型均比较复杂, 世界上不同血清型和基因型的 IBV 株几乎均可在我国分离到。正是由于 IBV 存在不同种类的基因型, 导致其抗原性多种多样, 进而导致 IBV 免疫失败不断发生, 给养禽业造成了巨大的经济损失<sup>[10-12]</sup>。本研究自 2012 年初陆续从我国辽宁、天津、山东等

北方地区分离到 13 株 IBV, 筛选出 4 株 IBV 进行动物回归试验, 证实均可引起鸡呼吸道和肾的病变。序列分析表明, IBV 流行株与 H120 等 Mass 型经典疫苗株及新型疫苗 4/91 株相比, 均有较大的差别(分属于不同的基因型)。

对 IBV S1 基因大量的研究表明: 该基因一般存在 3 个高变区(HVR), 分别位于第 3—25、52—154 和 266—294, 而这些位点通常与 IBV 决定抗原性的中和抗体位点密切相关<sup>[13]</sup>。本研究分离的 13

表 5 1999—2013 年 IBV 流行株 N 基因的核苷酸变异频率

Table 5 N gene mutation frequency of IBV isolates from 1999 to 2013

| 毒株<br>Strain | 分离年<br>Year of isolation | nt 变异数量<br>Variation number<br>of nt | 转换(P)<br>Transition | 颠换(Q)<br>Tranversion | 变异频率<br>Mutation frequency | 年平均变异率( $\times 10^{-3}$ )<br>Mutation frequency<br>per year ( $\times 10^{-3}$ ) |
|--------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|---|
| LX4          | 1999                     | 0                                    | 0                   | 0                    | 0                          |   |
| TJ-1/13      | 2013                     | 78                                   | 59                  | 19                   | 0.076                      |   |
| GM/13        | 2013                     | 82                                   | 62                  | 20                   | 0.080                      | 5.1(4.8~5.4)  |
| LY-1/13      | 2013                     | 75                                   | 57                  | 18                   | 0.072                      |   |
| LY-3/13      | 2013                     | 82                                   | 60                  | 22                   | 0.081                      |   |

株 IBV 流行株的 S1 变异位点恰好集中在第 53—150 和 250—290 位,提示 IBV 毒株的分子变异可能是导致 IBV 抗原性变异的重要基础,也是疫苗在我国免疫失败的主要原因<sup>[14]</sup>。

研究表明,IBV 的 N 基因富含碱性氨基酸,相对保守,这一结果有利于 N 蛋白与核酸的结合,但已有报道证实 N 基因也存在不同程度的变异<sup>[15-16]</sup>。本试验证实,4 株 IBV 分离株 N 基因与 H120 相比,核苷酸(氨基酸)相似性不足 87% (90%),变异主要以点突变为主,无核苷酸的插入和缺失,其中在 179—236 位、340—370 位碱性氨基酸区域变异较大。该氨基酸残基位于第一个线性 B 细胞抗原表位(175—241 位)<sup>[17]</sup>、CTL 的抗原表位(290—409 位)<sup>[18]</sup>和线性 B 细胞抗原表位(310—370 位、360—409 位)区域内,而这种变异往往会改变病毒诱导的宿主 B 淋巴细胞的反应性。

IBV 基因组为不分节段的正股单链 RNA,具有特殊的转录机制,在先导 RNA 序列与基因内部起始位点之间有 7~18 个核苷酸是相同的,且 RNA 聚合酶沿着模板“跳跃前进”,这正是导致 IBV 具有较高重组率的重要原因,也是促成 IBV 发生自然突变的原因之一<sup>[19-20]</sup>。本研究分离鉴定的 4 株 IBV,其 S1 基因与 A2 株相似性最高,而其 N 基因则与 LX4 株最高,由此推断 IBV 分离株可能是 A2-like 和 LX4-like 类型毒株在 S1 和 N 基因层面上的重组,有待通过实验室进一步证实<sup>[20]</sup>。此外,综合本实验室近二十年对 IBV 的研究结果,首次对其 S1 和 N 基因的核苷酸变异频率进行统计学比较,计算出了 IBV 在不同年代的基因变异频率。上述工作有待进一步深入研究。

尽管中国 IBV 十分复杂,但其变异有着十分明

显的“时间和地域性”特点。本研究分离到的 13 株 IBV 高度一致,且与 1998 年在我国北方发生的 A2-like 类型毒株密切相关,而与欧洲株 4/91-like 明显不同,是中国所特有的毒株<sup>[21-22]</sup>。因此,应加强对 IBV 流行株的跟踪研究,研制合适的疫苗,这对合理防控 IB 意义重大。

## 4 结 论

IBV 流行株是 A2-like 和 LX4-like 在 S1 和 N 基因层面上的重组。在近十年,IBV 流行株 N 基因的核苷酸年平均变异频率为  $5.1 \times 10^{-3}$ ,明显高于 S1 基因的变异频率( $2.4 \times 10^{-3}$ )。

## 参考文献(References):

- [1] BOURSNEILL M E, BROWN T D, FOULDS I J, et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. *J Gen Virol*, 1987, 68(Pt1): 57-77.
- [2] HONG S M, KWON H J, KIM I H, et al. Comparative genomics of Korean infectious bronchitis viruses (IBVs) and an animal model to evaluate pathogenicity of IBVs to the reproductive organs [J]. *Viruses*, 2012, 4(11): 2670-2683.
- [3] STERN D F, SEFTON B M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins [J]. *J Virol*, 1982, 44(3): 794-803.
- [4] CAVANAGH D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. *Vet Res*, 2007, 38(2): 281-297.
- [5] CAVANAGH D, DAVIS P J, COOK J K, et al. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus [J]. *Avian Pathol*, 1992, 21



- (1):33-43.
- [6] CAVANAGH D, ELUS M M, COOK J K, et al. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection *in vivo* [J]. *Avian Pathol*, 1997, 26 (1):63-74.
- [7] GELB Jr J, WEISMAN Y, LADMAN B S, et al. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000) [J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(3):194-203.
- [8] LADMAN B S, LOUPOS A B, GELB J Jr. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization [J]. *Avian Pathol*, 2006, 35(2):127-133.
- [9] 李海峰, 卢亦愚, 严菊英, 等. 我国麻疹病毒流行株的 H 和 N 基因变异速率探讨[J]. 中国病毒学, 2006, 21 (6):541-545.
- LI H F, LU Y Y, YAN J Y, et al. H and N gene variation rate of measles virus strain in China[J]. *Virologica Sinica*, 2006, 21(6):541-545. (in Chinese)
- [10] BING G X, LIU X, PU J, et al. Different genotypes of nephropathogenic infectious bronchitis viruses co-circulating in chicken population in China [J]. *Virus Genes*, 2007, 35(2):333-337.
- [11] LIU S W, ZHANG X, WANG Y, et al. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses[J]. *Inter-virology*, 2009, 52(4):223-234.
- [12] XU C, ZHAO J, HU X, et al. Isolation and identification of four infectious bronchitis virus strains in China and analyses of their S1 glycoprotein gene [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 122(1-2):61-71.
- [13] KUSTERS J G, NIESTERS H G, LENSTRA J A, et al. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV [J]. *Virology*, 1989, 169(1):217-221.
- [14] LIU S, CHEN J, HAN Z, et al. Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China [J]. *Avian Pathol*, 2006, 35(5):394-399.
- [15] PARK J Y, PAK S I, SUNG H W, et al. Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea [J]. *Virus Genes*, 2005, 31 (2):153-162.
- [16] 马亚珍, 韩宗玺, 邵昱昊, 等. 中国 2005 年~2006 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株核蛋白基因的遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6):420-424.
- MA Y Z, HAN Z X, SHAO Y H, et al. Genetic variations of N protein gene of infectious bronchitis viruses strains isolated in China between 2005 and 2006[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(6):420-424. (in Chinese)
- [17] SEAH J N, YU L, KWANG J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 75(1):11-16.
- [18] SEO S H, WANG L, SMITH R. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection[J]. *J Virol*, 1997, 71(10):7889-7894.
- [19] PARK J Y, PAK S I, SUNG H W, et al. Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea [J]. *Virus Genes*, 2005, 31 (2):153-162.
- [20] 徐怀英, 张伟, 秦卓明, 等. 自然发生的 1 株传染性支气管炎病毒 S1 和 N 基因之间的重组[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(10):1290-1295.
- XU H Y, ZHANG W, QIN Z M. One isolate of natural recombination between the S1 gene and N gene of infectious bronchitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(10):1290-1295. (in Chinese)
- [21] ZOU N L, ZHAO F F, WANG Y P, et al. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China [J]. *Virus Genes*, 2010, 41 (2):202-209.
- [22] LIU X L, SU J L, ZHAO J X, et al. Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus (IBV) strain in China [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1):56-65.